

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. D. Cremer

**Ist Koprophagie verantwortlich für unterschiedliche Ergebnisse
bei biologischer und chemischer Thiamin-Bestimmung?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hans-Georg Schilling
aus Hofgeismar

Gießen 1969

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. D. Cremer

**Ist Koprophagie verantwortlich für unterschiedliche Ergebnisse
bei biologischer und chemischer Thiamin-Bestimmung?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hans-Georg Schilling
aus Hofgeismar

Gießen 1969



Dekan : Professor Dr, H. Rettig
Referent : Professor Dr. H.D. Cremer
Korreferent : Professor Dr. H.J. Eggers

Tag der mündlichen Prüfung : 24. November 1969

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Problemstellung</u>	3
2.1. Divergenz der Ergebnisse von biologischer und chemischer Thiaminbestimmung	
2.2. Kritische Wertung der Bestimmungsmethoden von Thiamin	4
2.3. Biosynthese des Thiamins und Zweck der eigenen Untersuchungen	7
3. <u>Material und Methode</u>	12
3.1. Tiermaterial	12
3.2. Tierhaltung und Fütterung	12
3.3. Zusammensetzung des Versuchsfutters und Herstellung	14
3.4. Testkriterien	18
3.5. Rechnerische Behandlung des Zahlen- materials	18
3.6. Durchführung der Thiaminbestimmung	19
4. <u>Experimentelles Vor- gehen</u>	21
4.1. Kritische Wertung mehrerer Methoden zur Ausschaltung der Intestinalflora bei Ratten	21
4.2. Weiterentwicklung einer sogenannten Kotfalle	24
4.3. Hauptversuch	29
5. <u>Ergebnisse und Dis- kussion</u>	31
6. <u>Schlußfolgerung und kurze Zusammenfassung</u>	41
7. <u>Literaturangaben</u>	42

1. Einleitung

Die Auswirkung der modernen Zivilisation und hier vor allem die der Industrialisierung haben auch die Ernährungsphysiologie vor neue und schwerwiegende Aufgaben gestellt. Die in den letzten Jahrzehnten immer schneller fortschreitenden Änderungen der wirtschaftlichen und sozialen Verhältnisse beeinflussen die Ernährungsgewohnheiten und die Qualität der Nahrung. Die geringe körperliche Belastung weiter Volksschichten infolge Übernahme der schweren Arbeit durch Maschinen, die geringe Belastung durch Witterungseinflüsse auf Grund verbesserter Wohn- und Arbeitsplatzverhältnisse und nicht zuletzt auch die verminderte körperliche Bewegung als Folge der Motorisierung haben ein erhebliches Absinken des Kalorienbedarfs nach sich gezogen. Da viele Menschen eine entsprechende Reduzierung der Kalorienzufuhr nicht vornehmen, ist das Problem der Überernährung daher heute für die Industrienationen von einer wesentlich größeren praktischen Bedeutung, als es früher der Fall war. Dabei hat sich der Bedarf an Eiweiß und den meisten Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen nicht oder kaum verringert. Somit stehen wir vor der nicht zu unterschätzenden Schwierigkeit, mit einem verringerten Nahrungsvolumen absolut gleiche, relativ aber größere Mengen an den letztgenannten Nährstoffen aufzunehmen. Aus diesem Grund muß heute der qualitativen Zusammensetzung der Nahrung besondere Aufmerksamkeit zugewendet werden. Dies um so mehr als ein wesentlicher Anteil der heutigen Nahrung, bestehend aus Fetten mit hohem Energiegehalt

und aus raffinierten Produkten wie Mehl und Zucker, relativ wenig zur Deckung des Bedarfs an Wirkstoffen beiträgt. Hinzu kommt, daß durch die Konzentrierung großer Menschenmassen in den Großstädten, fern von der Erzeugung der Lebensmittel, die Transportwege und Lagerfristen größer werden. Hierdurch und infolge der deshalb in vermehrtem Umfang angewandten Konservierung kommt es zu einem Abfall des Gehaltes an gegen Licht, Sauerstoff und Wärme empfindlichen Nährstoffen, so daß eine ganze Anzahl von Nahrungsmitteln häufig nur noch einen Bruchteil ihres ursprünglichen Gehalts an bestimmten Vitaminen enthalten.

Im Zuge der fortschreitenden Arbeitsteilung und Spezialisierung innerhalb der Volkswirtschaft werden die Be- und Verarbeitung von Nahrungsmitteln und die Zubereitung von Speisen in großem Umfang aus dem Haus in die Ernährungsindustrie verlagert. Dieser Vorgang führt zwangsläufig zu einer immer stärkeren Technisierung der Erzeugung, Verarbeitung und Konservierung von Lebensmitteln. Auch hat die Zubereitung von Lebensmitteln in technischem oder halbtechnischem Umfang in Werksküchen, Kantinen (Gemeinschaftsverpflegung) oder Gaststätten stark zugenommen. Infolge dieser Entwicklung sind im allgemeinen unsere Nahrungsmittel wesentlich stärkeren Veränderungen unterworfen, die den ernährungsphysiologischen Wert beeinträchtigen können.

Die Produktion von Nahrungsmitteln und die Zubereitung von Gerichten in technischem Umfang bietet aber gegenüber derjenigen auf Selbstversorgerbasis nicht nur den Vorteil der Kostensenkung, sondern insbesondere auch die Möglichkeit, wissenschaftliche Erkenntnisse allgemein und exakt zur Verbesserung der Ernährung zu nutzen. Das gilt für alle Stufen der Herstellung hin bis zum fertigen Gericht. Neben Geschmack, Form und Farbe interessiert dabei vor allem der Nährwert, der von dem Gehalt an den

lebensnotwendigen Nährstoffen abhängt. Besondere Beachtung ist natürlich solchen Nährstoffen zu widmen, deren Gehalt in einer irgendwie vorbehandelten Nahrung nicht immer optimal ist. Zu diesen gehört das Thiamin. Man ist daher bemüht, u.a. durch schonende Verfahren den ursprünglichen Gehalt der Lebensmittel an Thiamin weitgehend zu erhalten.

2. Problemstellung

2.1. Divergenz der Ergebnisse von biologischer und chemischer Thiaminbestimmung

Da bei der Zubereitung und Konservierung von Nahrungsmitteln die Anwendung von Hitze die wichtigste Rolle spielt, und Thiamin relativ hitzeempfindlich ist, kann der Thiamingehalt in Nahrungsmitteln durch Wärmeeinwirkung erheblich verringert werden. Daß dieser Thiaminverlust mit chemischen Untersuchungsmethoden möglicherweise nicht eindeutig nachweisbar ist, ließen orientierende Versuche im Institut für Ernährungswissenschaft I annehmen. Auf Grund von Thiaminbestimmungen mit Hilfe der Thiochrommethode erschienen die Erhitzungsverluste an Thiamin größer, als nach den Ergebnissen des biologischen Tests anzunehmen war; letzterer wurde an Ratten durchgeführt.

Um dieses Ergebnis nachzuprüfen, war folgender Versuchsplan aufgestellt worden: Es wurde von einer thiaminfreien Modellmischung aus gereinigten Nährstoffen ausgegangen, die außer Thiamin alle anderen Nährstoffe in Mengen enthielt, die den Bedarf von Ratten mit Sicherheit decken. Die Modellmischung wurde aufgeteilt in zwei Reihen von Proben, A und B. Den Proben der Reihe B wurde eine bestimmte Menge Thiamin in Reinsubstanz zugesetzt. Innerhalb der Reihen wurden die Proben unterschiedlich lang und stark erhitzt und zwar so, daß die Erhitzungsbedingungen bei den Proben der Reihe B mit den entsprechenden bezeichneten Proben der Reihe A genau übereinstimmten. Mit der Thiochrommethode wurde dann der Thiamingehalt in den

Proben der Reihe B ermittelt. Den Proben der Reihe A wurde eine so hohe Thiaminmenge in Reinsubstanz zugesetzt, wie in den entsprechend erhitzten Proben der Reihe B mittels chemischer Methodik gefunden wurde. Die Parallelproben der Reihen A und B hätten im biologischen Versuch mit Ratten gleiches Wachstum hervorrufen müssen, wenn die beiden gegenübergestellten Methoden, biologische- und Thiochrommethode, gleiche Ergebnisse erbrächten. Die Tiere der Reihe B zeigten besseres Wachstum, demnach mußte in den Modellmischungen der Reihe B deutlich mehr von den Ratten verwertbares Thiamin vorhanden sein als analytisch ermittelt wurde. Diese Ergebnisse konnten in einem zweiten Versuch bestätigt werden.

Als Voraussetzung für Überlegungen, wie es zu dieser Divergenz kommen könnte, ist eine kritische Wertung der Thiaminbestimmungsmethoden angebracht.

2.2. Kritische Wertung der Bestimmungsmethoden von Thiamin

Für die Thiaminbestimmung sind neben der Spezifität der Bestimmungsreaktionen eine ausreichende Empfindlichkeit des Bestimmungsverfahrens und der Kosten- und Zeitaufwand von Bedeutung. Zur Bestimmung des Thiamins wurden ursprünglich nur biologische Methoden benutzt (38,44). Die verschiedenen Modifikationen wurden zu einer Zeit ausgearbeitet, in der das reine Thiamin noch nicht zur Verfügung stand. Im Prinzip beruhen sie einfach darauf, daß man Versuchstiere durch eine geeignete Ernährung in einen Thiaminmangel bringt und dann das auf seinen Thiamin-gehalt zu testende Futter gibt. Aus Besserung bzw. Behebung der Ausfallerscheinungen wird auf den Vitamingehalt geschlossen. Die biologischen Methoden sind im allgemeinen verläßlich; die zu erzielende Genauigkeit hängt vorwiegend von der auch bei reinerbigen Tieren vorhandenen individuellen Streubreite ab. Als Maß für die Thiaminversorgung

können im Gegensatz zu anderen Vitaminen die verschiedensten Kriterien herangezogen werden:

Das Wachstum des Versuchstieres (44), die Heilung der durch Thiaminmangel hervorgerufenen Polyneuritis (44), die Normalisierung der Herztätigkeit (19), die Thermoregulierung (9), oder der Oestralzyklus (6). Die meist benutzten Versuchstiere sind Ratten und Tauben. Die biologischen Methoden dienen heute fast ausschließlich zur Kontrolle der mit chemisch-physikalischen und mikrobiologischen Methoden erzielten Ergebnisse bei der Bestimmung des Thiamingehaltes verschiedenster Naturstoffe.

Zur mikrobiologischen Bestimmung des Thiamins werden die verschiedensten Arten von Mikroorganismen verwendet, u.a. Schimmelpilze, Hefen und Milchsäurebakterien. Die Auswertung der Wachstumszunahme erfolgt je nach der Methode und der Art des Mikroorganismus gravimetrisch, durch Messung der Größe der Wuchszonen, turbidimetrisch oder titrimetrisch.

Seit dem Jahr 1933, als von Jansen (40) ein chemisch-physikalisches Bestimmungsverfahren beschrieben wurde, kamen andere Methoden zur Anwendung. Wegen ihrer großen Empfindlichkeit ist heute in der Praxis die fluorometrische Bestimmung des durch Oxydation gebildeten Thiochroms am gebräuchlichsten. Sehr selten werden kolorimetrische-, polarographische- und spektrophotometrische Methoden angewandt. Titrations- und gravimetrische Verfahren können nur bei reinen Wirkstofflösungen und hohen Konzentrationen an Thiamin angewandt werden. Alle genannten Methoden können durch Begleitstoffe mehr oder minder stark beeinflusst werden, so daß zur Isolierung und Anreicherung von Thiamin aus natürlichem Material verschiedene chromatographische Verfahren herangezogen werden müssen.

Bei Anwendung der sogenannten "Thiochrommethode" auf biologisches Material können ebenfalls mannigfaltige Störungen auftreten. Diese Tatsache findet ihren Ausdruck in einer fortlaufenden Reihe neuer Veröffentlichungen über Modifikationen, die die Verbesserung der ursprünglichen Methode zum Ziel haben, besonders bei der Bestimmung in natürlichem Material. Sie gelten weitgehend einer Verbesserung der Extraktion und der Ausschaltung von Störstoffen.

Als Ursache für die bei der chemischen Thiaminbestimmung in erhitzten Nahrungsmitteln bzw. Futtermischungen offensichtlich beobachteten Fehler sind folgende Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen: Es können beim Erhitzen Thiaminderivate entstehen, die noch biologisch wirksam sind, sich aber der chemischen Bestimmung entziehen. Weiter wäre es möglich, daß Substanzen auftreten, die einmal die Fluoreszenz des Thiochroms zu löschenvermögen, zum anderen die Oxydation des Thiamins zum Thiochrom behindern. Schließlich könnte das Thiamin oder das Thiochrom an Futterbestandteile oder Stoffe, die infolge Erhitzens entstehen, gebunden werden, so daß sich abweichende Extraktionswerte ergeben.

Bei kritischer Wertung des erwähnten parallel zu der analytischen Thiaminbestimmung durchgeführten Wachstumstestes mit Ratten ergibt sich kein Anhalt, daß hier infolge eines banalen Irrtums ein falsches Ergebnis erzielt worden wäre. Fehler wie Verwechslungen, Fehlberechnungen u.ä. sind ziemlich unwahrscheinlich, da die Tierversuche in verschiedenen Arbeitskreisen des Institutes, zeitlich und räumlich getrennt, durchgeführt wurden und zu gleichen Ergebnissen führten. Den Versuchsreihen A und B wurde Thiamin vom gleichen Hersteller und aus derselben Sendung zugesetzt, so daß die Möglichkeit entfällt, daß der Reihe A zugesetztes

Thiamin weniger wirksam gewesen wäre. Ein Argument gegen die Richtigkeit des Thiamintestes mit Ratten bleibt jedoch bestehen. Zur Erläuterung sind einige Ausführungen über die Biosynthese von Thiamin im Intestinaltrakt notwendig.

2.3. Biosynthese des Thiamins und Zweck der eigenen Untersuchung

Seit der epochemachenden Entdeckung Eijkmanns hat die Wissenschaft große Erfolge in der Aufklärung der spezifischen Eigenschaften des Thiamins erzielt. Während um die Jahrhundertwende die Bekämpfung der Beri-Beri-Krankheit und in den dreißiger Jahren die Stoffwechselfunktionen des Thiamins im Vordergrund standen, konzentriert sich die Forschung heute auf wenige Gebiete wie das der biochemischen Funktion des Thiamins, seine Nachweismethoden und seine Biosynthese. Hierbei interessiert besonders die Antwort auf die Frage, ob der Thiaminbedarf des Organismus ausschließlich durch die Vitaminzufuhr mit der Nahrung gedeckt wird, oder ob das von Mikroorganismen der Darmflora aus nicht wirksamen Vorstufen gebildete Thiamin an der Deckung des Thiaming Gesamtbedarfes beteiligt ist.

Die offensichtliche Notwendigkeit von Mikroben für die normale Entwicklung bestimmter Pflanzen brachte bekanntlich 1885 Louis Pasteur (63) - sein Mitarbeiter Duclaux (20) hatte entsprechende Versuche mit sterilen Hülsenfrüchten unternommen - auf den Gedanken, ähnliche Experimente mit keimfreien Tieren durchzuführen, um die Wirkung der Mikroflora zu studieren. Er hatte dabei die feste Überzeugung, daß die Intestinalflora eine wichtige Funktion im lebenden Organismus hat. Wenig später 1886, wurden die Pasteur'schen Gedanken von Nencki (61) aus theoretischen Überlegungen heraus ange-

griffen. Hinsichtlich der Rolle, die die Darmbakterien bei der Bildung aromatischer und anderer vermeintlich toxischer Substanzen spielen, verwarf er die Möglichkeit eines Synergismus von Flora und Wirtsorganismus. 2 Jahre nach Pasteurs Äußerungen stellte Bouchard seine Theorie auf, nach der die Anwesenheit von Bakterien in den unteren Darmabschnitten darauf zurückzuführen ist, daß hier die Abwehrkräfte des Wirtsorganismus zu ihrer Beseitigung nicht mehr ausreichen. Bei diesen gegensätzlichen Ansichten über die Bedeutung der Intestinalflora blieb es lange Zeit, obwohl zahlreiche Versuche zur Klärung dieser Frage unternommen wurden.

Diese Versuche sind ein wichtiger Teil der allgemeinen Geschichte der Vitaminforschung. Sie sind eng mit der Erforschung eines von Bakterien produzierten Wachstumsfaktors, dessen Identität Jahre später als Vitamin B₁ aufgeklärt wurde und für den heute die Bezeichnung Thiamin gilt. Eingehende Versuche zu diesem Fragenkomplex wurden erstmals 1906 unternommen (72). Damals und in den folgenden Jahren wurde durch eine ganze Anzahl von Versuchen die nützliche Wirkung von Darmbakterien wahrscheinlich gemacht; schließlich konnte nachgewiesen werden, daß die verschiedensten Bakterienkulturen zur Vitaminsynthese in der Lage sind (7, 62, 16). Scheunert und Schieblisch (71) konnten z.B. zeigen, daß Kulturen von *Bazillus vulgatus*, die in einem an B-Vitaminen armen Nährboden gewachsen waren, Heilwirkung bei polyneuritischen Ratten hatten. Kulturen bestimmter Mikroorganismen waren somit auch in der Lage, B-Vitamine zu synthetisieren. Dazu hatte Theiler (76) schon 1915 festgestellt, daß Wiederkäuer von einer Zufuhr an B-Vitaminen unabhängig sind. Er führte dies auf die ausgedehnte Mikroflora im Pansen der Wiederkäuer zurück. Monogastrische Tiere sind

im Gegensatz zu Wiederkäuern im allgemeinen auf eine ausreichende Zufuhr der B-Vitamine mit der Nahrung angewiesen. Dieser Unterschied beruht auf der verschiedenartigen Anatomie des Verdauungskanals. Bei Wiederkäuern liegt der Pansen als Hauptort der mikrobiellen Tätigkeit vor dem Dünndarm, bei monogastrischen Tieren ist der Ort der stärksten Mikrobenbesiedelung der Blind- und Dickdarm.

Bis heute hat man neben anderen auch eine große Anzahl von Mikroorganismen gefunden, die in der Lage sind, Thiamin zu produzieren. Es zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Art der Thiaminsynthese bei den einzelnen Mikroben. Während Tiere auf die exogene Zufuhr von Thiamin angewiesen sind, können Pflanzen und viele Mikroorganismen das Thiamin aus den beiden Hauptkomponenten Pyrimidin und Thiazol aufbauen bzw. eine oder beide Komponente synthetisieren. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei der mikrobiellen Biosynthese des Thiamins im Verdauungssystem der Tiere vor, wodurch der tägliche Vitaminverbrauch beeinflusst werden kann. (22,26). Zusammenstellungen thiaminsynthetisierender Mikroorganismen werden von zahlreichen Autoren gebracht (2, 35, 46, 60, 65, 75).

Einen Beweis dafür, daß auch bei Nichtwiederkäuern eine Darmflora besteht, die in der Lage ist Thiamin zu synthetisieren, hat man in letzter Zeit mit Untersuchungen über die "Sparwirkung" bestimmter Substanzen erbringen können (69). Aus der Vielzahl der Arbeiten über eine Sparwirkung gewisser Kohlenhydrate seien einige angeführt. Verfüttert man schwerverdauliche Kohlenhydrate, z.B. Sorbit, an Ratten, so gelangen diese ins Colon und Coecum und führen dort zu einer Stimulierung der Darmflora und einer gesteigerten Synthese an Vitaminen (34, 39, 57, 12). So berichten Morgan und YUDAIN (19), daß bei Gabe von Sorbit das Caecum bei Ratte und Maus sich vergrößert und an Ge-

wicht zunimmt. Gassmann et al. (29) finden bei Sorbitfütterung die Zahl der anaerob wachsenden Lactobazillen erhöht. Andere Autoren berichten über die verschiedensten Kohlenhydrate Ähnliches (69, 36, 56, 34), und es scheint trotz abweichender oder sogar gegenteiliger Ergebnisse einiger Autoren so zu sein, daß eine echte Stimulierung der enteralen Thiaminsynthese vorliegt. Von den verschiedensten anderen Substanzen wird eine ähnliche thiaminsparende Wirkung beschrieben, unter anderem von Antibiotika (70, 33, 41, 5), Ascorbinsäure (15, 55, 3) und gewissen Alkoholen (36, 54).

Mehrere Hypothesen wurden aufgestellt, den Mechanismus dieser Thiaminsparwirkung zu erklären. Von Bedeutung ist aber, daß es ohne Mikroflora keine Sparwirkung gibt, wie Untersuchungen an keimfreien Tieren gezeigt haben. Auch bei Verhinderung der Koprophagie (13, 29, 12) oder nach Coeektomie macht sich keine Sparwirkung mehr bemerkbar. Der Spareffekt kann auch durch Verabfolgung schwerresorbierbarer Sulfonamide und eine dadurch erzielte Verringerung der Darmkeime beeinträchtigt werden (12, 13.) Alle diese Ergebnisse, sie seien unten im einzelnen aufgeführt, tragen auch mit zur Stützung der These bei, daß die Besiedlung des Intestinaltraktes mit Mikroorganismen erst in den letzten Abschnitten des Dünndarmes beginnt und ihre größte Dichte und damit größte Syntheseleistung in Colon und Caecum hat (79, 78, 39):

- 1.) Leichtverdauliche Kohlenhydrate, die nicht in das Caecum gelangen, stimulieren die enterale Synthese nicht.
- 2.) Schwer resorbierbare Sulfonamide, die ins Caecum gelangen, führen zu einer Depression der Syntheseleistung.
- 3.) Während einer Stimulierung der enteralen Synthese kommt es zu einer Vergrößerung und Gewichtszunahme des Caecums.
- 4.) Die Vitaminsparwirkung kann durch Ausschalten der koprophagie verhindert oder eingeschränkt werden.

Auf Grund eingehender Untersuchungen kann man annehmen,

daß Thiamin fast ausschließlich im Dünndarm resorbiert wird (27, 28, 30, 42). Zudem ist ca. die Hälfte des Thiamins fest an die Bakterienzelle gebunden (78, 1) oder in einer Verbindung, aus der es erst im Verlauf des Verdauungsvorganges abgespalten werden kann (79, 42). Soweit die Produkte der Mikroben nicht wie bei Wiederkäuern und Koprophagen den Dünndarm passieren, wird somit aus der enteralen Synthese weder generell noch regelmäßig oder kontrollierbar ein Nutzen gezogen (29, 50, 12, 58, 64). Man darf aus diesen Versuchen den Schluß ziehen, daß für den Menschen allein der Gehalt der Nahrung an Thiamin entscheidend ist.

Nachdem der grundlegende Unterschied zwischen den Menschen und dem von uns gewählten Versuchstier Ratte hinsichtlich der Verwertung des intestinal synthetisierten Thiamins herausgestellt worden ist, läßt sich der bereits angedeutete Zweifel an der Richtigkeit der Thiaminbestimmung mit Ratten etwa so begründen:

1.) besteht die Möglichkeit, daß zusätzlich zu einem vitaminarmen Futter der Makroorganismus intestinal synthetisiertes Thiamin verwertet, dies über den Umweg der Koprophagie, da einmal, wie oben erwähnt, ca. 50% des Thiamins fest in der Bakterienzelle gebunden sind und zum anderen eine nennenswerte Resorption im Dickdarm nicht stattfindet. 2.) besteht speziell bei erhitztem Futter die Möglichkeit, daß durch die Hitzeeinwirkung Substanzen entstehen, als Verbindung des Thiamins mit anderen Stoffen oder als Bruchstücke des Thiaminmoleküls, die für den höher entwickelten Organismus zwar keine direkte Thiaminwirkung mehr haben, aber von den Mikroorganismen des Intestinaltraktes resynthetisiert bzw. reaktiviert werden und auf dem Wege der Koprophagie nach erneuter Verdauung zur Thiaminversorgung beitragen. Der Rattentest würde somit einen - im Vergleich zur chemischen Analyse - zu hohen Thiamingehalt in erhitzten Nahrungsmitteln nur vortäuschen, wenn diese Arbeitshypothese zutreffen würde. In der vorliegenden Arbeit

sollte diese Annahme dadurch überprüft werden, daß bei einem Teil der Tiere die Koprophagie unterbunden wurde.

3. M a t e r i a l u n d M e t h o d e

3.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten wachsende männliche, konventionell gehaltene Ratten. Die Tiere wurden im Alter von 21 Tagen aus einer gewerblichen Zucht ⁺) bezogen. Es wurden nur männliche Tiere verwendet, um die allgemein gegenüber weiblichen Tieren bessere Wachstumsintensität bei wesentlich geringerer Streubreite der Einzelwerte auszunutzen.

3.2. Tierhaltung und Fütterung

Die Tiere wurden im Versuch in Einzelkäfigen gehalten, deren Boden aus Maschendraht bestand. Die Einzelhaltung ermöglichte eine bessere Beobachtung der Tiere, eine genaue Bestimmung des Futterverbrauches und andere Versuchskriterien und erleichterte das Arbeiten mit Kotfallen. Diese Art der Aufstallung ist auch deshalb von Vorteilen, weil auf diese Weise unterbunden wird, daß geschwächte oder gestorbene Tiere aufgefressen werden, was sonst immer wieder beobachtet wird. Künstliches Licht sorgte von 7⁰⁰ bis 19⁰⁰ Uhr für eine gleichmäßige Ausleuchtung des Versuchsraumes. Eine vollautomatische Klimaanlage ermöglichte eine gleichbleibende Tierraumtemperatur von + 23⁰ bis + 25⁰ Grad C. und eine relative Luftfeuchtigkeit im Bereich von 50 bis 60%.

Die vom Züchter verandten Tiere wurden zunächst für 10 Tage in Sammelkäfige mit Hobelspaneinstreu gesetzt.

⁺) Royal Wistar, Meier-Arend, Bad Salzuflen

Während dieser Zeit wurden die Tiere beobachtet und kränkelnde Tiere ausgeschieden.

Das Futter bestand für die ersten 3 Tage zu gleichen Teilen aus Haferflocken und aus einer halbsynthetischen Kost, die kein Thiamin enthielt. Weitere 7 Tage erhielten die Tiere eine thiaminfreie, 60 Minuten auf 140° erhitzte halbsynthetische Kost. So wurden einmal die Thiaminreserven der Tiere erschöpft, zum anderen konnten Tiere, die das erhitzte Futter nicht oder ungern aufnahmen, aussortiert werden. Nach dieser Eingewöhnung wurden in der Weise Versuchsgruppen gebildet, daß Durchschnittsgewicht der Tiere und Streuung der Einzelgewichte weitgehend übereinstimmten; außerdem kamen die Tiere in Einzelkäfige. Trinkwasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Zu Anfang des Versuches wurde für jedes Tier eine bestimmte Futtermenge eingewogen. Durch Rückwägen wurde die Menge des verzehrten Futters bestimmt und der Futterwirkungsquotient errechnet. Durch die von Hötzel und Müller (59) beschriebene Maschendrahtfütterung wurde das bei Ratten sonst übliche Verstreuen des Futters weitgehend verhindert.

3.3. Zusammensetzung des Versuchsfutters und Herstellung

Bei der Herstellung des Versuchsfutters wurde von folgender Modellmischung ausgegangen:

<u>Tab. 1:</u>	10,0 g Zucker gemahlen
	21,6 g Reisstärke (DAB 6)
	40,0 g Casein (vitaminfrei) ⁺)
	14,0 g Butterfett gereinigt, vitaminisiert mit den Vitaminen A, E, D ⁺⁺)
	8,0 g Mineralstoffmischung USP XIII,2
	0,4 g DL Methionin
	1,6 g Reisstärke, darin 0,4 g Cholinchlorid
	4,0 g Reisstärke, darin gegebenenfalls Thiamin gelöst in angesäuertem Aqua Dest. eingestellt auf pH 3,5
	100,0 g

⁺) Nutritional Biochemicals Corp.Cleveland, Ohio, USA

⁺⁺) 300% A,D,E entsprechend für 14 g Butterfett

A = 3,0 mg Vitamin_A-Palmitat (1 Mill. I.E./g)

D = 0,000974 ml D₂, ölig (400.000 I.E./ml)

E = 30,0 mg DL - - Tocopherolacetat (DAB 6 pur.)

Das Butterfett wurde in folgender Weise hergestellt: Molkereibutter wurde in Aqua Dest. 45 Min. lang durchknetet; anschließend wurde das Wasser abgegossen und die Butter aufs neue eine weitere halbe Stunde mit Aqua Dest. geknetet. Nachdem durch diese Behandlung die wasserlöslichen Vitamine und das Salz der Butter entzogen waren, wurde sie unter starkem Rühren erhitzt; so wurden die hitzelabilen Vitamine zerstört. Das flüssige Fett wurde dann geseiht, um das durch die Hitze koagulierte Eiweiß aufzufangen. Anschließend wurden dem Butterfett die Vitamine A, D, E mit einem Zuschlag in Höhe von 50% zum Ausgleich von Erhitzungsverlusten zugesetzt.

Zuvor erwähnte Mineralstoffmischung wurde unter Verwendung von Substanzen mit der "p.a.", "reinst" oder "DAB 6" entsprechenden Reinheit folgendermaßen hergestellt:

Zusammensetzung und Arbeitsgang:

I. 222,2 g Zitronensäure werden in ca. 500 ccm heißem Aqua Dest. gelöst. Die gelöste Zitronensäure wird dann der folgenden Mischung II zugegeben.

II. 269,6 g	Ca Co ₃	
57,8 g	Mg Co ₃	(40% MgO)
68,4 g	Na ₂ Co ₃	(wasserfrei)
282,6 g	K ₂ Co ₃	(bei 180°C getrocknet)

Sodann werden in Aqua Dest. gelöst:

III. 234 mg	Mn SO ₄ + 4H ₂ O
40 mg	KJ
124 mg	Na ₂ F ₂
88 mg	K Al (SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O

Die Lösung III wird der Lösung I und II hinzugegeben. Anschließend werden gelöst:

IV. 14,88 g Eisencitrat (mit einem Eisengehalt von 17,5 %) in 296,6 g = 251,4 ml 36% iger Salzsäure.

Diese Lösung IV wird der Mischung I, II und III hinzugegeben. Letztlich werden der jetzigen Mischung noch

zugegeben:

V. 19,2 g = 10,4 ml 96 %iger Schwefelsäure,
238,6 g = 140,4 ml Phosphorsäure (86,5 %ig).

Die so hergestellte Mineralstoffmischung wird im Trockenschrank bei 98° C 24 Std. getrocknet. Anschließend wird die spröde Masse im Mörser fein zerstampft.

Die Auswahl der Mineralstoffmischung erfordert insofern Beachtung, als in der Literatur mitgeteilt wird, daß verschiedene Mineralstoffkombinationen B-Vitamine teilweise zerstören, so daß man keinen genauen Überblick über die Menge der tatsächlichen zugeführten Vitamine mehr hat (37,68). Die hier angewandte Mineralstoffmischung ist dahingehend überprüft, daß sie den Abbau von B-Vitaminen nicht fördert (37). Das Cholinchlorid wurde wegen seiner hygroskopischen Eigenschaft mit Reisstärke vorvermischt, Vitaminfreies Casein wurde aus dem Handel bezogen. Die einzelnen Bestandteile des Grundfutters wurden in einer Wanne zunächst grob und dann in einem Spezialmischer ⁺) gründlich gemischt.

Dem Futter der Tiergruppen der Reihe B wurden bestimmte Mengen an Thiamin zugegeben. Dann wurden alle Futtermischungen im Trockenschrank entsprechend der angegebenen Dauer und Temperatur erhitzt, wobei die Dauer erst von dem Zeitpunkt an gerechnet wurde, zu dem die entsprechende Temperatur erreicht war. Um den Einfluß des Erhitzens auf das Futter möglichst gleichmäßig zu halten, wurde es auf flache Petrischalen verteilt. Proben der B-Reihe wurden dann zur Thiaminanalyse mittels Thiochrommethode gegeben. Den Parallelproben der Reihe A wurde entsprechend dem analytisch ermittelten Thiamingehalt der entsprechenden

⁺)Löddige - Mischer Modell M20E

B-Probe das Thiamin untergemischt. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wurde der Gehalt der zu erhitzen- den Modellmischung an Saccharose auf 10% beschränkt. Dies geschah in Anlehnung an frühere Arbeiten, bei denen sich gezeigt hatte, daß die analytische Thiamin- bestimmung mittels Thiochrommethode bei einem sehr hohen Saccharosegehalt des Untersuchungsmaterials nicht anwendbar ist. Der Zuckergehalt der Modell- mischungen wurde dadurch herabgesetzt, daß der Anteil an den übrigen Bestandteilen verdoppelt wurde. Vor dem Verfüttern wurden deshalb alle Futterformen mit der gleichen Menge einer Mischung bestehend aus 96% Rübenzucker (davon die Hälfte gemahlen) und 4% Reisstärke "verdünnt". Der angeführte Anteil an Reisstärke enthielt als Zumischung die unten ange- führten Vitamine, die somit erst nach der Hitzeein- wirkung zugegeben wurden. Die Futtermischungen ent- hielten alle notwendigen Nährstoffe mit Ausnahme von Thiamin in optimaler Menge.

Tab. 2: Vitaminmischung ohne Thiamin pro 100 g Grund-
futter:

Riboflavin	1,0 mg
Pyridoxin	0,5 mg
Pantothensäure	5,0 mg
Inosit	40,0 mg
Cobalamin	0,002 mg
Nicotianamid	10,0 mg
p - Aminobenzoës.	10,0 mg
Biotin	0,030 mg
Folsäure	0,5 mg
Menadion	1,0 mg
Ascorbinsäure	18,0 mg

3.4. Testkriterien

Als Maßstab für den Thiamingehalt der Futtermischungen wurde die Gewichtszunahme der Ratten gewählt. 2 x pro Woche wurden die Tiere gewogen. Als weiteres Kriterium wurde die Futterwirkung als Verhältnis von Gewichtszunahme zu Futteraufnahme ermittelt, da dieser Maßstab sich normalerweise durch eine geringere Streuung auszeichnet.

3.5. Rechnerische Behandlung des Zahlenmaterials

Erfahrungsgemäß sind Art und Weise, in der statistische Unterlagen gewonnen werden, ganz vom Wesen des Objektes abhängig, auf welches sich die Untersuchungen beziehen.

Bei den vorliegenden Gruppenstärken von 12 Tieren wurde keine Normalverteilung, sondern eine STUDENT - Verteilung den Berechnungen zu Grunde gelegt.

Man berechnet Mittelwert ($\bar{x}$) und Varianz (s^2) nach folgenden Formeln:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \qquad s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

wobei n die Zahl der Versuchstiere ist.

Die Standardabweichung (s) ergibt sich aus:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Die Sicherung der Ergebnisse erfolgte nach dem t - Test. Bei Auswertung der Versuche wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5% als Grenzwert für die Signifikanz von Differenzen angesehen. Bei der graphischen Darstellung wurden nur jene Tiere mit ihren Meßwerten berücksichtigt, die den Versuch überlebten. Dadurch sollte eine zu große Variationsbreite innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen vermieden werden. Gestorbene Tiere wurden demnach so behandelt, als seien sie von Anfang an nicht im Versuch gewesen. Der Hauptversuch lief über einen Zeitraum von 8 Wochen.

3.6. Durchführung der Thiaminbestimmung

Bestimmte Mengen der B-Proben wurden nach dem Erhitzen zur Thiaminbestimmung gegeben und folgendem Analysengang unterzogen: Jede Einwaage wird in Zentrifugengläsern mit 50 ml 1 %iger HCl in einem siedenden H₂O - Bad 20 Min. unter gelegentlichem Umrühren erhitzt. Anschließend wird zentrifugiert (10 Min.), da das Futter in Salzsäure nicht vollständig löslich ist. Das Zentrifugat wird in einen 100 ml Meßkolben überführt, der Rückstand 3 x mit heißem H₂O ausgewaschen und erneut zentrifugiert. Die Waschwasser werden mit dem Extrakt vereinigt. Nach Abkühlen des Zentrifugates auf 20° C wird mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Davon werden 50 ml abpipettiert und mit 40 ml Isobutanol in einem Scheidetrichter eine Min. geschüttelt.

Nach Trennung des Gemisches in 2 Schichten wird die Isobutanolphase verworfen. Von der wässrigen Phase werden 3 Proben zu 10 ml entnommen und der Oxydation zugeführt. Einmal 10 ml gelten als Blindwert und werden anstelle des Oxydationsmittels mit 3 ml 15 %iger NaOH

30 Sek. geschüttelt; durch die Lauge wird das Thiamin zerstört, so daß nur die fremden Fluoreszenzen ohne Thiochrom vom Isobutanol aufgenommen werden. Die Fluoreszenz (Blindwert) wird von der Gesamtfluoreszenz der Testlösung abgezogen.

Als Oxydationsmittel dient eine Mischung aus 24 ml 15 %iger NaOH und 1 ml 1 %iger Kaliumferricyanidlösung. In jeden der verwendeten Scheidetrichter wird neben 10 ml wässriger Thiaminlösung und 3 ml Oxydationslösung noch 15 ml Isobutanol gegeben. Dabei kommt zuerst Isobutanol, dann die Analysenlösung und schließlich die Oxydationslösung in den Scheidetrichter. Nach Zugabe der Oxydationslösung wird 30 Sek. geschüttelt. Haben sich die beiden Phasen getrennt, wird die wässrige Phase verworfen und die Isobutanolphase von verbliebenem Wasser und anderen Trübungen befreit, indem man sie über 5 g wasserfreies Natriumsulfat filtriert.

In gleicher Weise werden reine Thiaminlösungen mit einem Gehalt von 1 γ /10 ml dem Analysengang unterworfen. Die Fluoreszenzintensität von Probe- und Vergleichslösung wird in einem Spektralphotometer PMQ mit Fluoreszenzzusatz ZFN₄ der Firma Zeiss bestimmt. Zur Eichung des Meßgerätes dient eine Chininsulfatlösung.

Die Berechnung des Thiamingehaltes erfolgte nach folgender Formel:

$$K_p = \frac{F_p \quad x \quad K_v}{F_v}$$

Fv= % Fluoreszenzintensität der Vergleichslösung

Fp= % Fluoreszenzintensität der Probe

Kv= Konzentration an Thiamin in der Vergleichslösung

Kp= Konzentration an Thiamin in der Probelösung

4. Experimentelles Vorgehen

4.1. Kritische Wertung mehrerer Methoden zur Ausschaltung der Intestinalflora bei Ratten

Grundsätzlich hätten mehrere Methoden zur Überprüfung unserer Arbeitshypothese dienen können. Am elegantesten, aber auch am teuersten, dürfte das Arbeiten mit keimfreien Tieren (32, 42) sein. Das gnotobiotische Experiment hat seine besten Möglichkeiten in folgenden Forschungsbereichen: 1. Vergleichende Studien zwischen keimfreien Tieren und Kontrolltieren gestatten die Untersuchung physiologischer Effekte der normalen mikrobiellen Flora auf das Wirtstier. 2. Die Verwendung vorher keimfreier Tiere, denen bekannte Mikroben in den Darmtrakt injiziert werden, erlaubt es, die Wirkung bestimmter Keimarten festzustellen, insbesondere, ob die Wirkung indifferent, günstig oder ungünstig für den Wirtsorganismus ist.

Das keimfreie Tier, das nicht von der normalen Flora "belästigt" wird, stellt ein gleichmäßigeres experimentelles Modell dar, als seine normalen Gegenstücke aus der konventionellen Tierhaltung. So reagiert der keimfreie Organismus einheitlicher, da alle Störfaktoren der normalen Flora ausgeschaltet sind. Kritisch betrachtet, zeigt jedoch der Wirtsorganismus ohne Flora beträchtliche Abweichungen von den physiologischen Tatsachen, die sich im Verlauf der Phylogenese entwickelt haben (32); jedoch schaltet man, was oft übersehen wird, mit der keimfreien Haltung nicht nur die Darmflora aus, sondern auch alle anderen nachweisbaren Begleitmikroben und deren Effekte in und am Organismus.

Eine andere nicht so aufwendige und gezielt auf den Verdauungskanal gerichtete Methode besteht darin, Substanzen wie schwerresorbierbare Sulfonamide und

und Antibiotika zu füttern, die eine hemmende Wirkung auf die Mikroflora haben. So berichten Marshall et al. (49) 1940, daß Sulfaguanidin eine bakteriostatische Wirkung auf die Darmflora entfaltet. Coates et al. (11) beschreiben 1946, daß Sulfonamide eine Depression der Thiaminsynthese in der Darmflora hervorrufen. Es wurden hierauf in zahlreichen Arbeitsvorhaben die verschiedensten Sulfonamide zum Studium der Vitaminmangelkrankheiten angewandt (14,51,53,57). Bei Arbeiten mit Sulfaguanidin (47) zeigten sich jedoch nachteilige Nebenwirkungen, so daß diese Methode in länger dauernden Versuchsvorhaben nicht oder nur bedingt Anwendung finden kann. Dies gab Veranlassung, eine Kombination von Antibiotica auszuprobieren, die sich bei stärkerer Wirksamkeit als weniger toxisch für die Versuchstiere erwies. (73). In-
dessen war es für unser Vorhaben nicht notwendig, die mikrobielle Besiedlung des Darmtraktes zu beeinträchtigen. Es genügte vielmehr, die Ausnutzung des von den Darm-
mikroben synthetisierten Thiamins unmöglich zu machen. Dazu muß man die Tiere daran hindern, ihren Kot zu fressen; man mußte also die Koprophagie verhüten.

Durch die grundlegenden Arbeiten von Barnes et al. (4) wurde nachgewiesen, daß auch Ratten, die auf Drahtböden gehalten werden, Koprophagie betreiben und ca. 50 - 60% des Kotes sofort wieder aufnehmen. Dieser Prozentsatz soll sich bei Mangelernährung noch erhöhen. Somit ist die Koprophagie eine der Hauptfaktoren, der die Übertragung der im Tierversuch mit Nagern gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen erschwert. Dies gilt insbesondere auch für Untersuchungen zur Ermittlung des Thiaminbedarfs.

Zur Verhütung der Koprophagie werden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben. Man verfolgt dabei zwei Wege: 1. Es wird einmal der Ratte der Zugang zum After durch Bewegungseinschränkung verwehrt. So wurden Versuche unternommen, die Bewegung des Tieres durch Anlegen eines

Korsetts einzuschränken. Diese Bemühungen sind, wie Geyer et al. (31) ausführen, jedoch unbefriedigend verlaufen, da alle diese Geräte die Tiere zu sehr belästigen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden sogenannte "Coprophagy- Preventing - Cages" konstruiert. So beschrieben unter anderem Geyer et al. einen "Circular - Type - Cage", in dem sich das Tier praktisch nur im Kreis bewegen kann und außerdem einen "Tubular - Type - Cage", in dem sich das Tier nur geringfügig vor- und zurück bewegen kann. Metta et al. (52) beschreiben einen Käfig nach Art der "Tubular-Type- Cages". Weitere Konstruktionsvorschläge zu ähnlichen Apparaten kommen von Schwartz, Dümmler und Friemel (21). Diese Apparaturen zur Verhinderung der Koprophagie stellen für die Tiere eine große Belastung dar und sind zudem bei ihrer Anwendung im umfangreichen Versuchen mit einem erheblichen Kostenaufwand verbunden.

2. Es wird der Kot gleich am After des Versuchstieres aufgefangen. Barnes et al. (4) entwickelten dafür eine sogenannte "Fecal - Collection - Cup", für die am hiesigen Institut der Name "Kotfalle" geprägt wurde. Das Barnes'sche Modell besteht aus einer Plastikbüchse, die über den Schwanz dicht an den Anus geschoben wird und die mittels eines Filzringes und eines Klebestreifens am Schwanz befestigt und somit am Abrutschen gehindert wird. Dieses Barnes'sche Modell hat aber nicht zu übersehende Nachteile. So muß die Kotfalle täglich beim Kotentleeren vom Schwanz gezogen werden, wodurch das Entstehen von Druckulcerationen und Infektionen begünstigt wird. Der Arbeitsaufwand und die Belastung der Tiere sind somit bei größeren und längeren Versuchen, die gerade für ernährungsphysiologische Probleme von Bedeutung sind, beträchtlich.

Aus diesen Gründen wurde die oberen zitierte Barnes'sche Kotfalle in einigen wesentlichen Punkten weiterentwickelt. Kaspar und Hötzel (37) hatten dieses

Modell schon insofern verbessert, als sie es mit einem Fenster versehen, das mit einem Metallbügel verschlossen werden kann und durch das eine Reinigung der Kotfalle möglich ist. Damit entfiel das tägliche Abstreifen vom Schwanz; problematisch blieb aber weiterhin die Befestigung der Kotfalle am Schwanz. Selbst bei sorgfältigstem Arbeiten läßt es sich nach eigenen Erfahrungen nicht sicher vermeiden, daß entweder die Kotfalle sich löst, weil der klebestreifen zu locker sitzt, oder der Schwanz zu stark abgeschnürt wird und es zu Durchblutungsstörungen, zum Absterben oder zu eitrigen Infektionen des Schwanzes kommt. Selbst wenn man zwischen Klebestreifen und Schwanz elastisches und poröses Material wie Schaumgummi oder dergleichen einlegt, werden diese Schwierigkeiten nicht wesentlich gemindert. Wegen der starken Schmerzen sind die Tiere sehr unruhig, fressen wenig, nehmen demzufolge schlecht an Gewicht zu und müssen oft infolge eitriger Infektionen aus dem Versuch genommen werden. Diese Nachteile dürften auch für ein Kotfallmodell zutreffen, das von Klinghardt publiziert wurde(45).

4.2. Weiterentwicklung einer sogenannten Kotfalle

Auf der Suche einer besseren Lösung wurde die oben beschriebene Kotfalle insofern verbessert, als eine neue Befestigungsmöglichkeit entwickelt wurde.

Die Kotfalle (Abb.1) besteht aus einem Plexiglasrohr von 4 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser. Das offene Ende dieses Zylinders, das mit einem Wulst zur besseren Auflage versehen ist, wird gegen das Hinterteil der Ratte geschoben, wobei der Schwanz durch eine 12 mm große Bohrung eines Plexiglasstopfens ragt, mit dem der Zylinder am distalen Ende verschlossen ist. Durch das mit einem Metallbügel verschlossene Fenster kann die Kotfalle gereinigt werden.

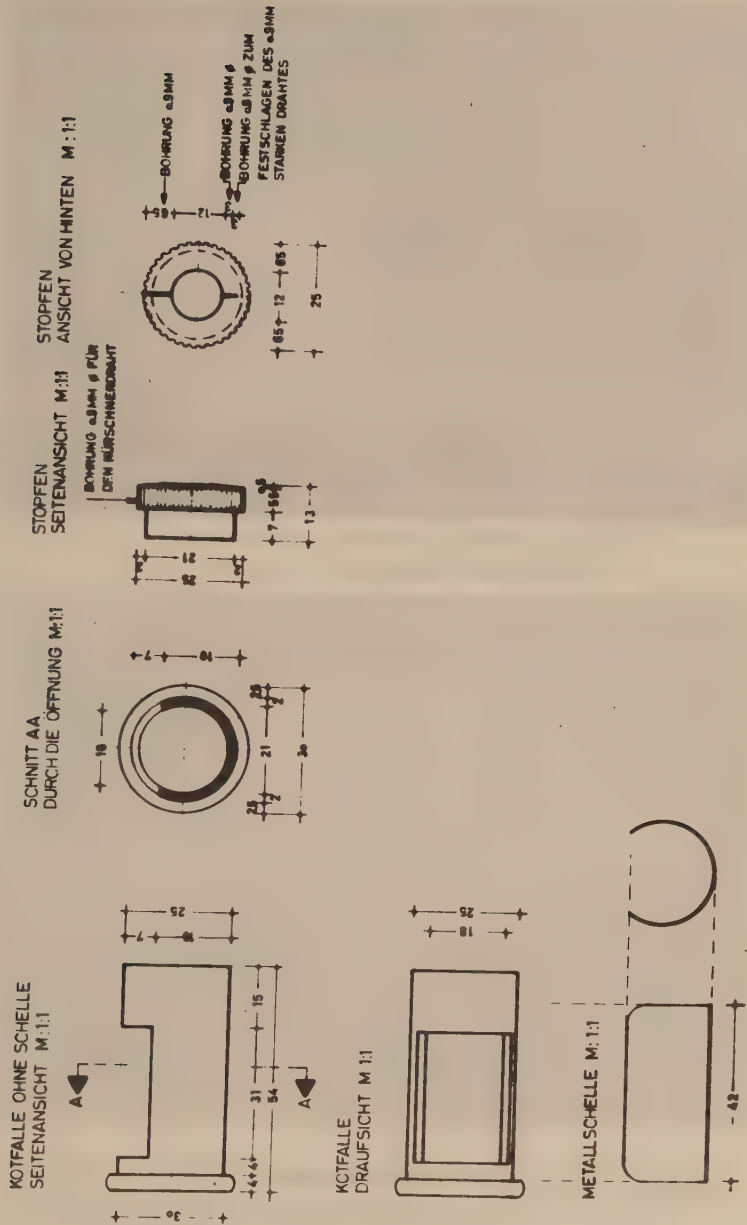


Abb. 1: Zeichnerische Darstellung des weiterentwickelten Kotfallenmodells



Abb. 2: Die Kotfalle am Versuchstier

Der herausragende Teil des Plexigalsstopfens, mit dem das distale Fallende bis auf den Durchlaß für den Schwanz geschlossen ist, wird quer zum Rohr und senkrecht zum Fenster folgendermaßen durchbohrt. Die oben liegende Stopfenwandung wird mit einem 0,9 mm starken Bohrer ganz durchbohrt, die unten liegende Stopfenwandung mit dem gleichen Bohrer 1,5 mm tief angebohrt. Letztere Bohrung wird mit einem 0,8 mm starkem Bohrer um weitere 1,5 mm fortgesetzt. Auf dem gereinigtem Schwanz der Ratte wird die Kotfalle aufgeschoben und mit mäßigem Druck am Hinterteil des Tieres fixiert. Dabei zeigt das Fenster der Kotfalle zur Lafebene. Durch die obere Bohrung wird ein angespitzter 0,9 mm starker Kirschnerdraht geführt, möglichst durch die Mitte des in der Stopfenbohrung liegenden Schwanzes gestochen und anschließend in der um 0,1 mm geringeren unteren Bohrung festgeschlagen. Die Drahtenden sitzen dabei möglichst am distalen Ende der Kotfalle, damit kein Kot an die Einstichstelle gelangt. Das Drahtende läßt man 3 mm überstehen und man kann so den Stift mit einer Zange leicht wieder herausziehen.

Die zur Verbesserung der oben beschriebenen Kotfalle durchgeführten kleineren Vorversuche brachten gute Ergebnisse, so daß es sinnvoll erschien, eine größere Versuchreihe zur Erprobung der verbesserten Kotfalle durchzuführen. Es wurden entsprechende Gruppen mit Sulfonamidapplikation (Sulfaguanidin) zum Vergleich angesetzt. Somit ergab sich ein Versuchsprogramm, in dem über 200 Tiere getestet wurden. Alle Tiere wurden nach der üblichen Einführungszeit auf ein durchschnittliches Anfangsgewicht von 70 - 80 g aufgefüttert, da noch leichtere Tiere durch das Anbringen der Kotfalle zu sehr belastet würden.

Der Versuch dauerte 70 Tage. Während lediglich 3 Kotfallentiere wegen Entzündung des Schwanzes aus dem Versuch genommen wurden, waren in den Sulfonamidgruppen eine uner-

wartet große Zahl von Todesfällen zu verzeichnen, die auf die Nebenwirkungen des verwendeten Sulfonamids zurückzuführen sind. Ein Vergleich der beiden Methoden ergab abgesehen von der Anzahl der gestorbenen Tiere keine signifikanten Unterschiede. Es starben wie auch in den oben zitierten Versuchsreihen (47) gerade in den ersten Versuchstagen einige Sulfonamidtiere. Etwa 10% der Tiere gingen später wegen Konkrementbildungen in Nieren und Blase ein. Bei Sektion zu Versuchsende wurden dann bei 20% aller mit Sulfonamid behandelten Tiere Konkremente aufgefunden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Kotfallenmethode wegen der geringen Tierverluste und der Nichtbeeinträchtigung des normalen Wachstums als geeignet für die Bearbeitung der genannten Fragestellung anzusehen ist.

4.3. Hauptversuch

Nachdem eine brauchbare Methode zur Verhinderung der Korpophagie entwickelt worden war, wurde das eigentliche Arbeitsvorhaben mit folgender Versuchsanstellung durchgeführt:

Tab. 3: Versuchsplan des Hauptversuches

Gruppenbezeichnung	K	A _I	B _I	A _{II}	B _{II}	A _{III}	B _{III}
Thiaminmenge in mg/100 g Futter:							
Vor dem Erhitzen	1,0	-	0,2	-	0,2	-	0,2
Nach dem Erhitzen zugesetzt	-	l.A. - +)	-	l.A. - +)	-	l.A. - +)	-
Minuten	60	120	120	120	120	60	60
Grad ^o C	140	100	100	100	100	140	140
Kotfalle				+	+	+	+

+) laut Analyse

Der Versuch wurde mit 7 Gruppen zu jeweils 12 Tieren angesetzt. Die Gruppe K diente als positive Kontrollgruppe, daneben auch zum Nachweis, daß trotz Erhitzen des Futters bei optimaler B₁-Versorgung normales Wachstum möglich ist, bzw. daß nur der Testfaktor Thiamingehalt im Futter für die Entwicklung der übrigen Versuchsgruppen entscheidend war. Die B- und K-Gruppen erhielten Thiamin vor dem Erhitzen zugesetzt. Den A-Gruppen wurde Thiamin entsprechend der Analyse mittels Thiochrommethode nach dem Erhitzen zugesetzt.

Aus Tabelle 3 ist zu ersehen, daß verschiedene Erhitzungsbedingungen angewandt wurden. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, inwieweit die analytisch ermittelten Thiaminwerte von der Intensität der Hitzebehandlung abhängen.

Die mittels Thiochrommethode ermittelten Verluste an Thiamin im Futter der B-Gruppen sind aus folgender Tabelle zu ersehen:

Tab. 4:

Gehalt an Thiamin ⁺)			
pro 100 g	0,2 mg%	1 mg%	0,2 mg%
Erhitzungsdauer	2 Std. 100°C	1 Std. 140°C	1 Std. 140°C
Wiedergefunden	0,189 [±] 0,03	0,805 [±] 0,03	0,162 [±] 0,004
Verlust	5,5%	19,5%	19,0%
Gruppen	B _I , B _{II}	K	B _{III}

⁺) Vor dem Verdünnen der erhitzten Modellmischung mit der gleichen Menge bestehend aus 96% Rübenzucker und 4% Reisstärke.

Da in dem 2 Stunden bei 100°C erhitzten Futter ein geringer Thiaminverlust eintrat als nach früheren Versuchen zu erwarten war, wurde den Futtermischungen A_I, A_{II}, B_I und B_{II} im Verhältnis 1 : 5 thiaminfreies Futter zugesetzt, um den Thiamingehalt in den optimalen Testbereich zu bringen.

5. Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von Ergebnissen, die in Arbeitsvorhaben des Institutes für Ernährungswissenschaft I gewonnen werden konnten, sollte festgestellt werden, ob möglicherweise Koprophagie die Ursache dafür ist, daß im Tierversuch bei Verfütterung von erhitzten Modellmischungen mehr Thiamin vorzuliegen schien, als auf Grund der analytischen Thiaminbestimmung mittels Thiochrommethode zu erwarten gewesen wäre.

Der Versuchsaufbau entsprach weitgehend dem der angeführten Vorversuche. Die Koprophagie wurde mit der weiterentwickelten Kotfalle verhindert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und in den Abbildungen 3 und 4 wiedergegeben. Der Versuch lief über einen Zeitraum von 8 Wochen. Der besseren Übersicht wegen erfolgt die Darstellung der Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen in einem Kurvendiagramm. Die Werte für den Gewichtszuwachs sind auf der Ordinate verzeichnet, während auf der Abszisse die Versuchsdauer in 7-tägigen Abständen aufgetragen wurde. Außerdem wurden Gewichtsentwicklung und Futterwirkung in einem Säulendiagramm dargestellt.

Aus den Versuchsgruppen A_I, B_I, A_{II}, B_{II}, A_{III}, und K verstarb je 1 Tier. Die Todesursache kann nicht mit Sicherheit angegeben werden, jedoch schien es sich um unspezifische Infektionen teils der Lunge, teils des Darmtraktes zu handeln. 1 Tier der Gruppe B_{III} mußte wegen seines vereiterten Schwanzes aus dem Versuch genommen

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse

Gruppe	Thiamin- zusatz vor Erhitzen	Hitzebe- handlung Min.	Grad	Thiamin- gehalt lt. Analyse	Thiaminzusatz nach Erhitzen	Kot- falle	Gewichts- zuwachs in g	Futter- wirkung	Unterschied
AI		120	100	-	0,189		108,5 ± 36,2	0,187 ± 0,029	P < 0,01
AII		120	100	-	0,189	*	157,5 ± 33,4	0,200 ± 0,022	P > 0,05
BI	0,2	120	100	0,189 ± 0,03	-		138,0 ± 47,7	0,210 ± 0,024	P > 0,05
BII	0,2	120	100	0,189 ± 0,03	-	*	154,6 ± 34,6	0,210 ± 0,022	P > 0,05
AIII	-	60	140	-	0,162	*	147,8 ± 36,8	0,210 ± 0,022	P < 0,05
BIII	0,2	60	140	0,162 ± 0,004	-	*	183,2 ± 38,8	0,230 ± 0,025	
K	1,0	60	140	0,805 ± 0,03	-		244,0 ± 30,4	0,207 ± 0,030	

1) Es handelt sich um doppelt so hohe Thiaminmengen; die Mischungen wurden vor dem Erhitzen mit der gleichen Menge bestehend aus 15 % Zucker und 1 % Reisstärke "verdünnt". (Begründung siehe Text)

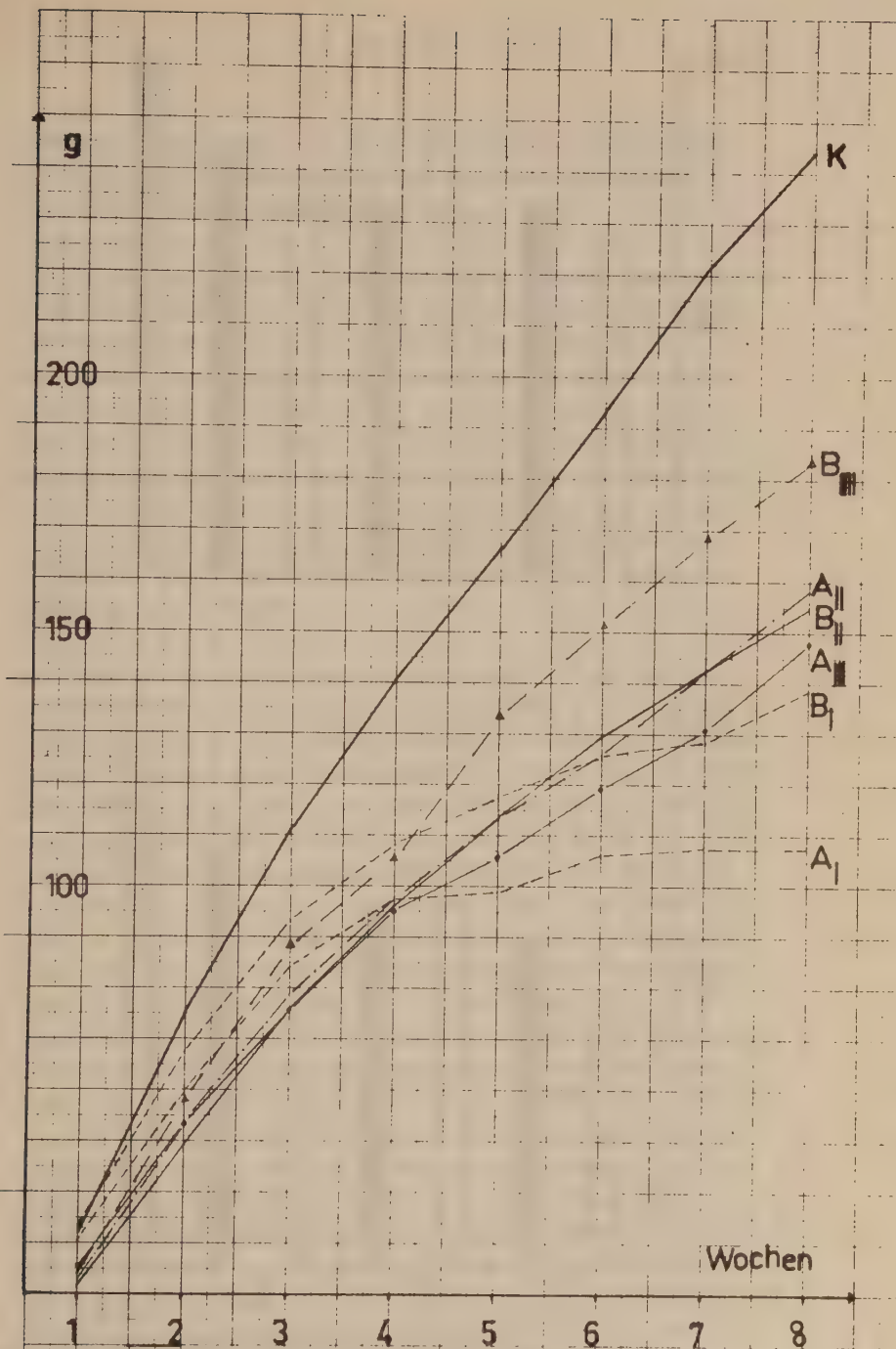


Abb. 3 Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen

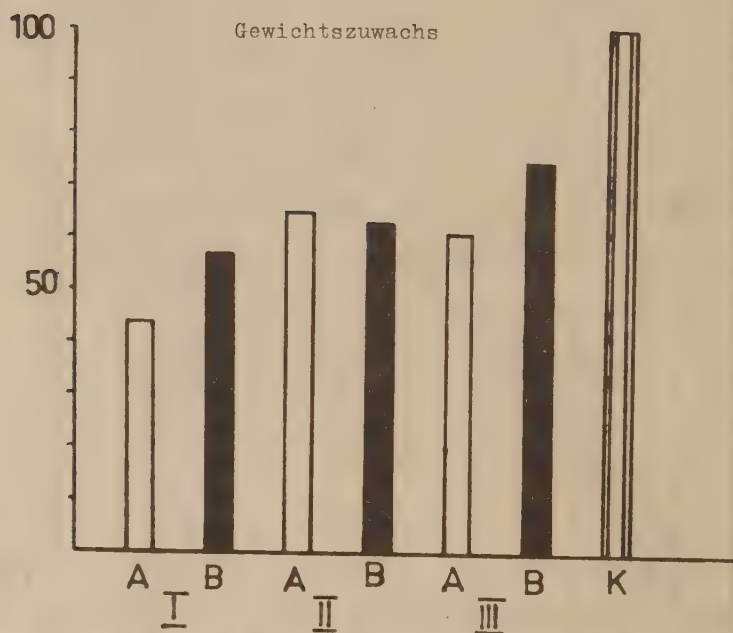
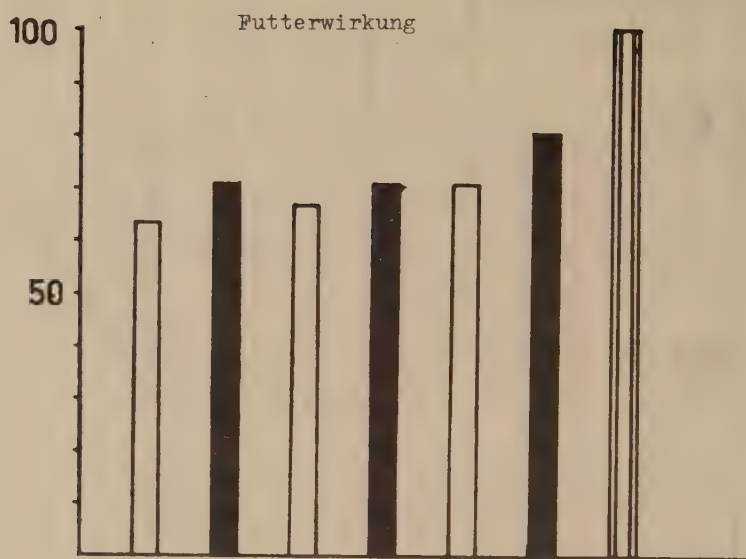


Abb. 4: Darstellung von Futterwirkung und Gewichtszuwachs in relativen Werten bezogen auf die Kontrollgruppe (= 100 %)

werden; es ist dies bei 48 Versuchstieren der einzige Ausfall, der mit Sicherheit auf die Anbringung der Kotfalle zurückgeführt werden kann.

Die Tiere der Gruppe k erhielten Futter der höchsten Erhitzungsstufe (60 Min. 140°C), dem Thiamin im Überschuß zugesetzt war. Als positive Kontrolle zeigten die Tiere dieser Gruppe eine signifikant bessere Gewichtszunahme gegenüber allen anderen Gruppen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Gewichtsentwicklung der übrigen Versuchstiere unabhängig von irgendwelchen Störfaktoren tatsächlich vom Thiamingehalt der Kost abhing. Für die Futterwirkung besteht ebenfalls ein gesicherter Unterschied der Gruppe K gegenüber allen anderen Versuchsgruppen.

Bei den zu vergleichenden Gruppen A_{III} - B_{III} ist die Gewichtsentwicklung von B_{III} signifikant besser als die von A_{III}. Die Tiere dieser Gruppen erhielten ebenfalls Futter der höchsten Erhitzungsstufe. Beide Gruppen waren mit Kotfallen versehen. Das Ergebnis entspricht dem der oben erwähnten Vorversuche, in denen vor allem in stark erhitzten Modellmischungen tierexperimentell deutlich mehr Thiamin nachzuweisen war. Im Rahmen des Gesamtversuches kann dieses Resultat nur so erklärt werden, daß zumindest bei höheren Erhitzungsstufen Substanzen entstehen, die im Tierversuch thiaminwirksam sind, sich aber der chemischen Bestimmung entziehen, bzw. diese stören. Da die Koprophagie ausgeschaltet war und mikrobiell synthetisiertes Thiamin nur in unwirksamen Mengen resorbiert wird, müssen die thiaminwirksamen Substanzen in vollem Umfang im Futter der Gruppe B_{III} vorhanden sein. Die Resorption hat in den oberen Darmabschnitten stattgefunden.

Der Unterschied in der Gewichtsentwicklung zwischen den kotfallenfreien Gruppen A_I und B_I ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,5$). Das schließt nicht aus,

daß tatsächlich mehr verwertbares Thiamin im Futter der Gruppe B_I vorhanden war. Derart kleine Unterschiede im Thiamingehalt einer Kost können jedoch tierexperimentell nicht eindeutig nachgewiesen werden; der Testbereich für den Tierversuch wird überschritten, dies um so mehr, als entsprechend unserer Arbeitshypothese nur ein Teil des analytisch nachweisbaren Thiaminverlustes tierexperimentell belegbar ist. Bei den gewählten Erhitzungsbedingungen wurden entgegen früheren Versuchen nur geringe Erhitzungsverluste analytisch nachgewiesen (5,5%).

Die A_I und B_I entsprechenden mit einer Kotfalle versehenen Gruppen A_{II} und B_{II} zeigten praktisch parallel verlaufende Wachstumskurven. Auffällig ist, daß die Wachstumskurven aller mit Kotfallen versehener Gruppen über denen der kotfallenen Tiere liegen. So ergeben sich bei einem Teil der Versuchsgruppen statistisch gesicherte Unterschiede im Wachstum zwischen den Kotfallengruppen A_{II} und B_{II} einerseits und den kotfallenen Gruppen A_I und B_I andererseits ($A_I - A_{II} = p < 0,01$). Hier ist zu betonen, daß wider Erwarten die Kotfallentiere trotz der Belastung durch die Kotfalle ein besseres Wachstum zeigen, wenn der Unterschied bei den Gruppen B_I und B_{II} statistisch auch nicht gesichert werden kann.

1.

Grundsätzlich werden in den vorliegenden Versuchen schon früher erzielte Ergebnisse bestätigt, die dahingehen, daß die in erhitzten Futtermischungen analytisch bestimmten Thiaminwerte häufig niedriger liegen als biologisch ermittelte Werte. In dieser Richtung deuten vor allem die Unterschiede zwischen den Versuchsreihen A_I und B_I , sowie zwischen A_{III} und B_{III} .

In einem der Versuchsteile, in dem beiden Tiergruppen eine "Kotfalle" angelegt wurde, so daß dadurch die Ko-
prophagie ausgeschlossen war, war ein Unterschied zwischen den beiden Bestimmungsmethoden in mäßig erhitzten Proben (100°C) nicht nachweisbar. Dieser Unterschied verschwand

aber nicht etwa deshalb, weil die biologisch bestimmten Werte nun mehr niedriger, sondern weil die analytisch bestimmten Werte höher lagen.

Bei stärker erhitzten Proben (140°C) ist der Unterschied zwischen den beiden Bestimmungsmethoden wieder nachweisbar, obgleich auch hier die Koprophagie ausgeschlossen war.

Eine Erklärungsmöglichkeit dafür, daß bei den beiden Tiergruppen (A_{II} und B_{II}), die das mäßig erhitze Futter erhielten, der Unterschied bei verhinderter Koprophagie nicht nachweisbar war, kann nicht gegeben werden.

Auffällig und völlig unerwartet war die in den Versuchsreihen des gesamten Versuches gemachte Beobachtung, daß ganz allgemein das Wachstum der Tiere, bei denen die Koprophagie unterbunden war, besser war, als bei den Tieren, die Zugang zu ihrem Kot hatten. Wenn auch die Deutung dieses Befundes außerordentlich schwierig ist, sollen doch einige Erklärungsmöglichkeiten diskutiert werden.

2.

Es ist allgemein bekannt, daß sich abhängig von bestimmten Wachstumsbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeitsgrad etc.) sowie beeinflusst durch die Ernährung oftmals auf mehr oder weniger engem Raum streng voneinander abgegrenzt Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, von Haenel als Biozönose bezeichnet, bilden. Befindet sich diese Biozönose mit dem Makroorganismus im Gleichgewicht, so spricht man von Eubiose; ist das Gleichgewicht gestört von Dysbiose (66). Den Begriff der Dysbiose kann man etwa mit dem von Catron eingeführten Begriff des "disease level" gleichsetzen(8). Catron versteht unter diesem Begriff eine Infektion der Futterstelle und der gesamten Umgebung der Tiere mit Mikroben, die ein schlechtes Gedeihen der Ver-

suchstiere hervorrufen. Es kann sich hierbei um toxinbildende Mikroorganismen handeln, wie z.B. *Clostridium perfringens*, die sogenannte subklinische Infektionen unterhalten und einen allgemein schlechten Gesundheitszustand " high disease level " verursachen, wodurch das Wachstum besonders von Jungtieren verzögert und begrenzt wird. Wichtig ist nun in diesem Zusammenhang, daß das Futter der Gruppen A_{II}, B_{II} und A_I, B_I 120 min. auf 100°C erhitzt und anschließend in Plastikeimern unter Verschuß aufbewahrt wurde. Es scheint dies insofern ein wichtiger Faktor zu sein, als dieses Futter als hochgradig keimarm angesehen werden muß. Damit ist in vermehrtem Maße die Möglichkeit gegeben, daß es zu einer Verschiebung der Keimsiedlung im Kot und der Umgebung der Versuchstiere kommt, d.h., es gewinnt ein bestimmter Mikrobenstamm oder mehrere Stämme das Übergewicht, woraus eine mehr oder weniger wirksame Infektion resultiert, die natürlich auch den Vitaminhaushalt des Versuchstieres belastet. Diese gegenseitige Beeinflussung von Mikroben konnte Tanami an keimfreien Tieren beobachten, denen er ausgewählte Floraprobe einverleibte (74). Für die mit Kotfallen versehenen Tiere ist es von Bedeutung, daß auf Grund der verhinderten Koprophagie eine dauernde und in erheblichem Maße stattfindende Re-Infektion mit der gerade vorhandenen Darmflora ausgeschlossen ist. Dieser Umstand und das hochgradig keimarme Futter dürften der Grund sein für das bessere Gedeihen der Gruppen A_{II} und B_{II}. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, daß bei mit Antibiotica behandelten Versuchstieren eine Wachstumsförderung beobachtet wurde, die wohl hauptsächlich durch Inaktivierung bestimmter Elemente der Darmflora bedingt ist (23, 10).

Für die Gruppen A_I, B_I fällt der Vorteil der Kotfalle weg. Sie sind auf Grund der Koprophagie einer immer neuen Infektion mit der veränderten Flora ausgesetzt. Die Käfighaltung und die zunehmende Verarmung an Thiamin führen zu einer vermehrten Koprophagie (4), dabei werden auch vom Körper und von der Mikroflora verwertete

energiearme Endprodukte erneut aufgenommen, die in unterschiedlichen Mengen die sogenannten enterogenen Toxine Indol, Skatol, Kresol, Phenol, Histamin und organische Säuren enthalten (17). Hierzu ist zu bemerken, daß schon unter normalen Bedingungen dem Wirtsorganismus die Aufgabe zukommt, gewisse Stoffwechselprodukte der Mikroflora zu entgiften und auszuschcheiden. Jede Anhäufung dieser Substanzen kann zur Autointoxikation führen (67).

Die sogenannte normale Darmflora besteht neben Symbionten auch aus solchen Mikroorganismen, die mit dem Wirt, d.h. dem die Mikroben beherbergenden Tier, um die in der Nahrung enthaltenen oder von anderen Bakterien produzierten Vitamine konkurrieren. So sind gerade die Vitamine der B - Gruppe für die Vermehrung zahlreicher Mikroben unerlässlich (67). Im Folgenden seien einige in unterschiedlichem Maße in der Darmflora vorkommende Mikroben, die Thiamin oder dessen Komponente benötigen, angeführt; *Escherichia coli* (Mutante), *Streptococcus salivarius* S 20 B, *Lactobazillus fermentum* 36, *Lactobazillus viridescens* S 38 A, *Lactobazillus fermentum* ATCC 9338 (24). Weiter sei hinzugefügt, daß auch evtl. im Darmtrakt vorkommende Pilze und Hefen Thiamin zum Wachstum und zur Vermehrung benötigen.

Als weitere Gruppe kann man innerhalb der Darmflora diejenigen Mikroben finden, die toxische Substanzen produzieren, welche einen störenden Einfluß auf das physiologische Geschehen im Organismus ausüben. Bekannt sind auch fakultativ pathogene Keime (evtl. als Mutante), die eine Infektion hervorrufen können. Als weitverbreiteter fakultativ pathogener Keim sei der *Bazillus subtilis* angeführt, der außerdem Thiamin zur Vermehrung benötigt. Auch ist bekannt, daß *Shigella Flexneri*, *Bazillus anthracis*, einige *Streptococci* und *Clostridien* an der Aufrechterhaltung einer schwachen Darminfektion beteiligt sein können (48, 77), wie überhaupt gesagt werden kann,

daß eine Vielzahl im allgemeinen apathogener Keime in der Lage ist, Intoxikationen hervorzurufen, wenn sie nur in genügender Anzahl vorhanden sind (18). Als starker Enterotoxinbildner sei der *Staphylococcus aureus* erwähnt.

Aus den verschiedensten Bakterien konnte eine Thiaminase isoliert werden, so aus dem anaeroben Bakterium *Clostridium thiaminolyticum* (25), aus dem *Bazillus thiaminolyticus* und dem *Bazillus aneurinolyticus* (43).

Aus obigem geht hervor, daß sich die Flora bestimmter Standorte und damit auch die Darmflora von Versuchstieren auf Grund verschiedener Gegebenheiten und durch eine Vielzahl von Mikroben verändert werden kann. Durch stärkere Keimverschiebungen, Pathogenwerden fakultativ pathogener Stämme, Überwuchern der Darmflora mit Hefen oder Standortwechsel einer Bakterienart, geht die normale Relation (Eubiose) verloren, es kommt zur Dysbiose. Die physiologischen Aufgaben der Darmflora bei Verdauung, Vitaminproduktion und Reduktionsvorgängen sowie bei Invasion fremder Keime sind damit entscheidend gestört.

Kritisch sei folgendes bemerkt:

Die Verwendung standardisierter Tiere bei experimentellen Untersuchungen ist heute eine Selbstverständlichkeit. Im allgemeinen betrifft dies den Tierstamm, das Futter, die Unterbringung der Tiere (Käfig, Klima). Eine Standardisierung der Kleinlebewesen im, am und um das Versuchstier wird dagegen noch weitgehend vernachlässigt, obwohl, wie oben angeführt, bekannt ist, daß diese Mikroökologie in hohem Maße heterogen, veränderlich und physiologisch aktiv ist. Dies wirkt sich im allgemeinen in der experimentellen Arbeit als Fehlerquelle aus, ist aber auf bestimmten Gebieten, wie dem der vorliegenden Arbeit, besonders störend.

6. Schl u ß f o l g e r u n g u n d k u r z e
Z u s a m m e n f a s s u n g

Grundsätzlich wird an einer Reihe von Versuchen der früher schon beobachtete Unterschied zwischen chemisch-analytisch und biologisch ermittelten Thiaminwerten in erhitzten Futtermischungen bestätigt. Für die Hypothese, daß der Unterschied nur deutlich wird, wenn die Koprophagie der Versuchstiere erhalten bleibt, daß er aber verschwindet, wenn man die Koprophagie unterbindet, ergeben die Versuche keine Stütze. Im Gegenteil wird erstaunlicherweise beobachtet, daß fast durchweg die Tiere der Gruppen, bei denen durch Anlegen einer Kotfalle die koprophagie unterbunden wurde, besser wuchsen als Tiere, die Zugang zum Kot hatten. Deutungsmöglichkeiten für diese Beobachtung werden diskutiert.

7. L i t e r a t u r a n g a b e n

- 1 ABDEL-SALAAM, A., LEONG, P.C.:
Biochem. J. 32, 958 (1938)
- 2 BANHIDI, Z.G.:
Ark. kemi. 15, 229 (1960)
- 3 BANHIDI, Z.G.:
Intern.Ztschr. Vit. Forschung 30, 305 (1960)
- 4 BARNES, R.H., FIALA, G., MC GHEE, B., BROWN, A.:
J. Nutr. 63, 489 (1957)
- 5 BARNES, R.H., KWONG, E., DELANY, K., FIALA, G.:
J. Nutr. 71, 149 (1960)
- 6 BOMSKOV, Ch.:
Methodik der Vitaminforschung, G. Thieme Verlag
Leipzig (1945)
- 7 BOTTOMLEY, W.B.:
Proc. roy. Soc. Land. (B) 88, 237 (1915)
- 8 CATRON, D.V.:
Antibiotika in der Schweinefütterung, Münchner
Symposium S. 64 (1954)
- 9 CEAMER, J., MOTTRAM, A.:
Lancet 2, 1093 (1925)
- 10 COATES, M.E., FULLER R., HARRISON G.F., LEV M.,
SUFFOLK S.F.:
Brit. J. Nutr. 17, 141 (1963)
- 11 COATES M.E., HENRY K.M., KON P.M., KON S.K.,
MAWSON E.H., STANIER J.E., THOMPSON S.Y.:
Nature 157, 262, 263 (1946)
- 12 CREMER H.D., HÖTZEL D.:
Internat. Ztschr. Vitaminforschung 29, 376 (1958-59)
- 13 CREMER H.D.:
Bibl. Nutr. Dieta 1, 105-113 (60)
- 14 DAFT F.S., SEBRELL W.H.:
Vitamins and Hormones 3, 49 (1945) Academic Press N.Y.
- 15 DAFT F.S.:
Federation Proc. 10, 380 (1951)
- 16 DAMON S.R.I.:
Biol. chem. 56, 895 (1923)

- 17 DENNIG H.:
Lehrbuch der Inneren Medizin, Georg Thieme Verlag,
Bd. II, 71 (1964)
- 18 Diagnostisch-Therapeutisches-Vademecum, Johann
Ambrosius Barth Verlag, S. 195 (1967)
- 19 DRURY A.N., HARRIS L.J., MAUDLEY O.:
Biochim. J. 24, 1632 (1930)
- 20 DUCLAUX E.:
Compt. rend. Acad. sc., Paris 100, 66 (1885),
zit. nach 32
- 21 DÜMMLER W., FRIEMEL H.:
Nahrung 8, 600 (1964)
- 22 EVENSON A., MC COY E., GEYER B.R., ELVEHJEM C.A.:
J. Bacteriol. 51, 513 (1945)
- 23 FORBES M. PARKS J.T.:
J. Nutr. 67, 69 (1959)
- 24 FRAGNER, J.:
Vitamine - ihre Chemie + Biochemie, Jena - Berlin,
2, 1485 (1965)
- 25 FUJITA, A., NOSE, Y., KURATANI, K.:
J. Vitaminol. (Japan) 1, 1 (1954)
- 26 GALL, L.S., ILLINGWORTH, B.A., COWGILL, G.R.,
FENTON, P.F.:
J. Nutr. 35, 27 (1948)
- 27 GASSMANN, B., HAENEL, H., KETZ, H.A., ZOBEL, N.:
Z. Ernährungswissenschaft. 5, 7 - 15 (1964)
- 28 GASSMANN, B., LEXOW, D., EHRT, D.:
Biochem. Z. 332, 449 (1960)
- 29 GASSMANN, B., KETZ, H.A., HAENEL, H.:
Nahrung 7, 9 - 20 (1963)
- 30 GASSMANN, B.:
Ernährungsforschung Band 10, Heft 1, 99 (1965)
- 31 GEYER, R.P., GEYER, B.R., DERSE, P., LINKHEIN, T.,
ELVEHJEM C.A., HART, E.B.:
J. Nutr. 32, 129 (1947)
- 32 GORDON, H.A.:
Triangel, Sandoz-Zeitschrift für Medizinische
Wissenschaft Band 7, Nr. 3, 111 (1965)

- 33 GUGGENHEIM, K., HALVEY, S., HARTMANN, I., ZAMIR, R.:
J. Nutr. 50, 245(1953)
- 34 HAENEL, H., ACKERMANN, H., RUTTLOFF, H.:
Naturwissenschaften 46, 325, 326 (1959)
- 35 HARRIS, D.L.:
Arch. Biochem. Biophysics 57, 240 (1955)
- 36 HEALEY, V.M., YUDKIN, J.:
Proc. Nutr. Soc. 18, 24 (1959)
- 37 HÖTZEL D.: Habilit.-Schrift, Med. Fakultät,
Giessen, 1961
- 38 HOFMEISTER P.:
Biochem. Z. 129, 718 (1922)
- 39 HOLLMANN S.:
Stärke 15, 208 - 212 (1963)
- 40 JANSSEN B.C.P.:
Nature 135, 267 (1935)
- 41 JONES J.D., BAUMANN C.A.:
J. Nutr. 57, 61 (1955)
- 42 KASPAR H., HÖTZEL D.:
Z. für Ernährungswissenschaft 4, 34 (1963)
- 43 KIMURA R., AOYAMA S.:
Vitamins (Japan) 4, 299 (1952)
- 44 KINNERSLEY H.W., PETERS R.:
Biochim. J. 28, 677 (1943) / 29, 2639 (1935)
- 45 KLINGHARDT, G.W.:
Zschr. Versuchstierk. 6, 31 (1965)
- 46 KNIGHT, B.C.J.G.:
Vitamins and Hormons 3, 105, 108 (1945)
- 47 KREIS, H.:
Inaugural-Dissertation, Giessen 1965
- 48 LEV, M., BRIGGS, C.A.E., COATES, M.E.
Brit. J. Nutr. 11, 364 (1957)
- 49 MARSHALL, E.K., BRATTON, H.J., WHITE, H.J.
LICHTFIELD, J.T.:
Bull. Johns Hopkins Hosp. 67, 163 (1940)

- 50 MEGHAL, S.K., NATH, M.C.:
Indian J. Exp. Biol. 1, 107, 108 (1963)
- 51 MEHNERT, B., MEHNERT, H., STUHLFAUTH, K.:
Klin. Wschr. 36, 1029 (1958)
- 52 METTA, V.G., NASH, L., JOHNSON, B.C.:
J. Nutr. 74, 473 (1961)
- 53 MICKELSEN, O.:
Vitamins and Hormons 14, 1 (1956)
- 54 MORGAN, T.B., YUDKIN, J.:
J. Physiol. 150, 17 (1960)
- 55 MORGAN, T.B., YUDKIN, J.:
Proc. Nutr. Soc. 20, 10 (1961)
- 56 MORGAN, T.B., YUDKIN, J.:
Vitamins and Hormons 20, 39 (1962)
- 57 MORGAN, T.B., YUDKIN, J.:
Nature 180, 543 (1957)
- 58 MORGAN, T.B., YUDKIN, J.:
Nature 184, 909, 910 (1959)
- 59 MÜLLER, R., HÖTZEL, D.:
Arch. Tierernährung 5, 65 (1955)
- 60 NAJJAR, V.A., BARETT, R.:
Vitamins and Hormons 3, 27 (1945)
- 61 NENCKI, M. :
Arch. Exper. Path. Pharmac. 20, 385 (1886)
- 62 PACINI, A.I.P., RUSSEL, L.D.W.:
J. of biol. chem. 34, 43 (1918)
- 63 PASTEUR, L.:
Compt. rend. Acad. sc., Paris 100, 68 (1885)
zit. nach 32
- 64 PEPPLER, E., MÜLLER, B., CREMER, H.D.:
J. Nutr. 71, 91 (1960)
- 65 PETERSON, W.H., PETERSON, M.S.:
Bacteriol. Rev. 9, 49 (1945)
- 66 REPLOH, H., OTTE, H.-J.:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart S. 90 (1965)

- 67 REPLOH, H., OTTE, H.-J.:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart S. 84
- 68 ROMBOUTS, J.E.:
J.Nutr. 50, 255 (1953)
- 69 RUTTLOFF, H., BOCK, W., ACKERMANN, H. :
Z. Ernährungswissenschaft. 2, 208 (1962)
- 70 SAUBERLICH, H.E.:
J.Nutr. 46, 99 (1952)
- 71 SCHEUNERT, M., SCHIEBLICH, M:
a) Zbl. Bakter. J. 88, 290 (1922)
b) M. Biochem. Z. 139, 57 (1923)
c) Biochem. Z. 184, 58 (1927)
- 72 SCHOTTELIUS, M.:
Arch. Hyg. 67, 177 (1908)
- 73 SEEGER, H.:
Inaugural-Dissertation, Giessen 1967
- 74 SELECTA:
49, 2937 (1966)
Bericht vom Symposium über Gnotobiologie,
abgehalten auf dem IX. Internationalen Kongress
für Mikrobiologie, Moskau Juli 1966
- 75 STEINMANN, H.G., CYAMA, V.I., SCHULZE, H.O.:
J. Biol. Chem. 211, 327 (1954)
- 76 THEILER, A., GREEN, H., V. VILJOEN, H.:
African. Dir. vet. Res. Rept. 3, 7 (1915)
- 77 WAGNER, M., WOSTMANN, B.S.:
Antibiot. Ann. 1958/59 P 1003
- 78 WOSTMANN, B.S., KNIGHT, P.L., KEELEY, L.L.,
KAN, D.P.:
Fed. Proc. 22, 120 (1963)
- 79 WOSTMANN, B.S., KNIGHT, P.L.:
J.Nutr. 74, 103 - 110 (1961)

Für die Überlassung des Themas, für die wohlwollende Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit und für die Korrektur danke ich Herrn Professor Dr. H.D. Cremer.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. G. Wilmes für die Anleitung und Förderung, die mir während meiner Arbeit zuteil wurde.

Lebenslauf

- Geboren:** Am 18.6.1941 als Sohn des
Dr. med. Wilhelm Schilling und
seiner Ehefrau Marianne, geb.
Thünken, in Gießen
- Schulbildung:** Herbst 1947 bis Ostern 1952 Volks-
schule Gießen
Ostern 1952 bis zur Reifeprüfung
am 27.2.1961 Herderschule Gießen
(Realgymnasium)
- Studium:** Medizinstudium ab Sommersemester
1961 bis Wintersemester 1963/64 an
der Justus Liebig-Universität in
Gießen
Sommersemester 1964 an der Julius-
Maximilian-Universität in Würz-
burg
Wintersemester 1964/65 an der
Christian-Albrechts-Universität
in Kiel
Sommersemester 1965 bis Sommersemester
1967 an der Justus Liebig-Universität
in Gießen
- Ärztliche Vorprüfung:
am 21.4.1964 bestanden
Ärztliche Prüfung:
am 1.11.1967 bestanden

